



# Aprendizaje activo dirigido a la selección de las condiciones cromatográficas en HPLC

<b>Apellidos, nombre</b>	Tortajada Genaro, Luis Antonio (luitorge@quim.upv.es) González Martínez, Miguel Ángel (mgonzal1@quim.upv.es)
<b>Departamento</b>	Departamento de Química
<b>Centro</b>	ETSIAMN-Universitat Politècnica de València



## 1 Resumen de las ideas clave

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es una de las principales técnicas instrumentales para obtener información química y molecular. Consiste en lograr el avance diferencial de las especies procedentes de una muestra compleja y alcanzar su separación, lo que permite su identificación y cuantificación. No obstante, existen diferentes variables que influyen en la capacidad de retención y elución de las especies en el interior del sistema y/o en la capacidad de ser detectadas. De hecho, una inadecuada selección conducirá a una separación nula o incompleta, que da lugar a resultados irreproducibles, inexactos e inespecíficos. En este artículo vamos a presentar las características básicas que hay que tener en cuenta a la hora de seleccionar las variables experimentales que afectan a la separación y, en consecuencia, a la calidad del resultado.

## 2 Objetivos

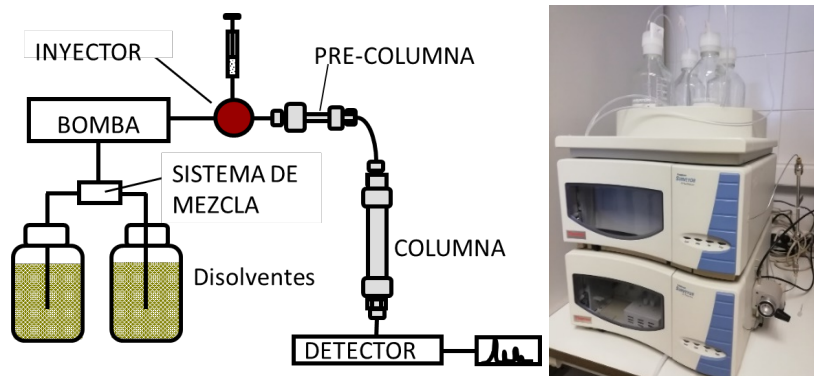
Una vez que el alumnado lea con detenimiento este documento, será capaz de:

- Identificar cómo afectan las variables experimentales en la separación cromatográfica.
- Realizar adecuadamente el cálculo de los parámetros cromatográficos a partir de los datos de los cromatogramas y su interpretación.
- Aplicar la metodología a la determinación analítica de azúcares mediante HPLC y extrapolar a otras separaciones.

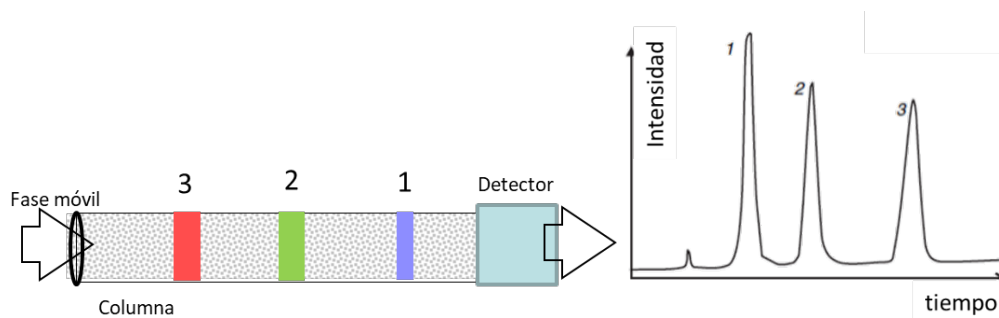
## 3 Introducción

La cromatografía es una técnica de **separación dinámica basada en fuerzas químicas**, en la que continuamente se producen equilibrios/interacciones de cada componente con las fases estacionaria (retención) y móvil (elución). La HPLC es una técnica separativa cromatográfica donde la fase estacionaria es un sólido o líquido adsorbido sobre sólido (partículas de 3-10  $\mu\text{m}$  altamente empaquetadas) y la fase móvil es un líquido impulsado a alta presión. Se caracteriza por originar métodos **multianalito** con excelentes prestaciones analíticas para su aplicación en áreas como la salud, alimentación, farmacéutica y medioambiente.

El instrumento empleado se denomina **cromatógrafo** y suele ser equipo modular (Figura 1). Consta de los siguientes elementos: depósito/s de disolventes, desgasificador, bomba, sistema inyección, conducciones, columna/s de separación, sistema de control de temperatura y detector/es.



El **cromatograma** es la representación gráfica de la respuesta del detector frente al tiempo. La señal registrada para cada especie está relacionada con su perfil de concentraciones a la salida de la columna y con su factor de respuesta en el detector. Es decir, la señal depende de la naturaleza de la especie porque afecta al proceso retención-elución y la capacidad de originar un fenómeno detectable.



El **pico** cromatográfico es la respuesta asociada a la detección de un compuesto, siendo más grande cuanto mayor sea la cantidad de analito en la muestra. En caso de coelución, es decir de separación ineficaz, el pico es suma de los diferentes componentes presentes. Cada pico se caracteriza por:

- Tiempo de retención ( $t_R$ ). Tiempo para el cual se produce el paso del compuesto por el detector. Corresponde con el máximo del pico en caso de un perfil de elución gaussiano.
- Altura ( $h$ ). Diferencia entre la señal máxima y la línea base.
- Área ( $A$ ). Superficie acotada por el pico y la línea base.
- Anchura ( $w$ ). Diferencia de tiempos entre el principio y final del pico.

Existen varios parámetros cromatográficos que se emplean para describir la calidad en la separación, tales como factor de respuesta, resolución y eficacia.



El **factor de respuesta** es la relación entre la señal generada (altura o área) y la concentración de dicha especie, siendo una medida de la sensibilidad del método. Generalmente, se obtiene a partir de la pendiente de la recta de calibrado, aunque se puede estimar utilizando un único patrón.

$$\text{Factor de respuesta} = \frac{\text{Señal}}{\text{concentración}} \quad \text{Ecuación 1}$$

La **resolución** (R) se utiliza para evaluar el grado de separación entre dos picos consecutivos. Es una medida de la selectividad porque con valor  $R > 1,5$  los picos se consideran resueltos.

$$R = \frac{t_{R,2} - t_{R,1}}{0.5 (w_1 + w_2)} \quad \text{Ecuación 2}$$

La **eficacia** es la medida de la capacidad del método para lograr la separación y evitar la dispersión de pico. Se expresa como el número de platos teóricos (N) de una columna asociados a un cierto analito. Cuanto mayor sea el valor, se puede lograr la separación de especies más parecidas.

$$N = \frac{16 t_R^2}{w^2} \quad \text{Ecuación 3}$$

Las prestaciones de un método cromatográfico dependen de las **condiciones experimentales** de la separación. La tabla 1 recoge las principales variables que afectan a la separación y/o detección.

Variables experimentales	Efecto
<b>Naturaleza de la fase estacionaria</b>	Cuanto más similar a los analitos, mayor retención. Afecta a los tiempos de retención y en consecuencia a la forma de los picos.
<b>Longitud de la columna</b>	Cuanto más larga, más número de platos, pero mayores tiempos de retención y, en consecuencia, picos más bajos y anchos.
<b>Naturaleza de la fase móvil</b>	Cuanto más similar a los analitos, mayor elución. Afecta a los tiempos de retención y, en consecuencia, a la forma de los picos.
<b>Caudal de la fase móvil</b>	Efecto descrito por la ecuación Van Deemter, existe un valor óptimo de máxima eficacia.
<b>Volumen de muestra inyectado</b>	No afecta a los tiempos de retención, pero afecta a la resolución y sensibilidad.
<b>Detector y condiciones de detección</b>	No afecta a los tiempos de retención, pero controla el factor de respuesta. Cuanto mayor sea, el sistema es más sensible

Tabla 1. Efecto de las principales variables cromatográficas en el cromatograma y en la calidad del método.



Por lo tanto, deben elegirse cada uno de ellos para lograr la mejor separación/detección posible y dé lugar a un método reproducible, selectivo y sensible que permita la identificación o cuantificación de todos los analitos presentes en la muestra.

## 4 Desarrollo

### 4.1 Metodología analítica

Como modelo, se utilizará el método oficial AOAC 977.20 que describe la **separación de azúcares** en miel. Se trata de un método HPLC con una columna con grupos terminales amino, siendo la fase móvil una mezcla de acetonitrilo y agua. El detector empleado mide la variación en el índice de refracción del eluato de la columna; este detector es universal, ya que la presencia de cualquier soluto modifica el índice de refracción de la disolución. Los valores se expresan en RIU (unidad de índice de refracción).

Los datos utilizados se han obtenido empleando un equipo de HPLC Surveyor Plus Thermo Scientific, consistente en una bomba que lleva un desgasificador integrado, una válvula de inyección Rheodyne de 6 vías con un bucle de muestra de 20  $\mu$ L, una precolumna y una columna analítica RP-NH<sub>2</sub> 5  $\mu$ m, de 25 cm de longitud y 4,6 mm de diámetro interno. El volumen de inyección es 20  $\mu$ L, la temperatura de trabajo es temperatura ambiente y caudal de fase móvil 1 mL/min.

El patrón se ha preparado en matraz aforado de 10 mL a partir de las disoluciones madre de glucosa, fructosa y sacarosa con agua Milli-Q. La disolución fue desgasificada en ultrasonidos durante 3 min. Las concentraciones finales del patrón fueron glucosa a 5 g/L, fructosa a 5 g/L y sacarosa a 5 g/L. Se registraron cromatogramas generados por el patrón en diferentes condiciones experimentales de la separación.

### 4.2 Datos de la separación cromatográfica

Veamos a continuación un ejemplo de los cromatogramas obtenidos en un análisis del patrón siguiendo el protocolo descrito a diferentes composiciones de fase móvil (Figura 3). La composición de acetonitrilo/agua se mantuvo constante a lo largo de toda la separación.

El programa que controla al cromatógrafo realiza el análisis de los datos recogidos en cada cromatograma y proporciona información sobre los picos registrados. Para aquellos picos que poseen un área superior a la correspondiente al límite de detección, los datos registrados se muestran en la Tabla 2.

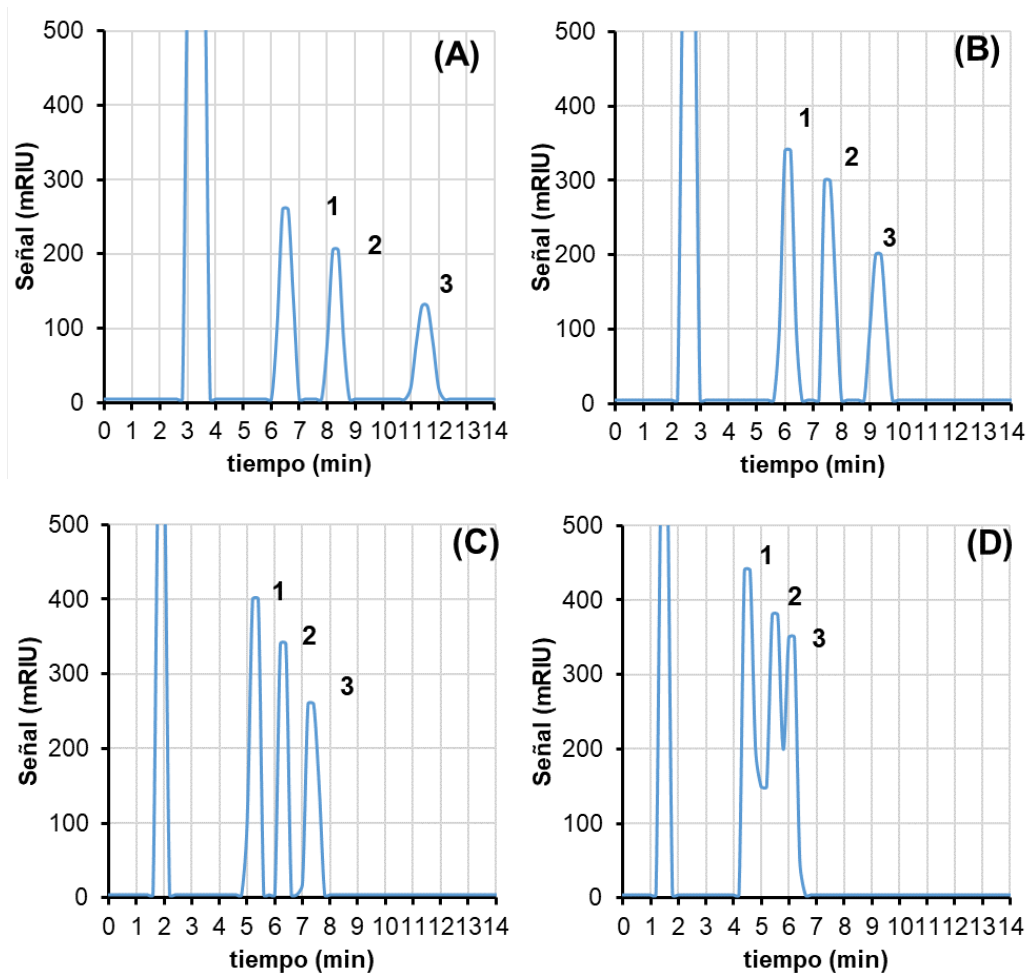


Figura 3. Cromatogramas de los experimentos a diferentes composiciones de la fase móvil. Pico 1: glucosa; Pico 2: fructosa; Pico 3: sacarosa. Acetonitrilo:agua (v/v) (a) 75:25, (b) 70:30, (c) 65:35 y (d) 60:40.

Pico	Tiempo retención (min)			Área (u.a.)			Anchura		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Separación A	6,4	8,3	11,6	5,85	6,51	6,51	0,8	0,9	1,3
Separación B	6,1	7,4	9,3	6,37	6,77	6,95	0,7	0,8	1,2
Separación C	5,2	6,3	7,6	6,42	6,76	7,10	0,7	0,7	1,0
Separación D	4,5	5,2	5,5	-	-	-	0,6*	0,7*	1,0*

Tabla 2. Datos de los cromatogramas obtenidos en los experimentos.  
\*Datos estimados

### 4.3 Cálculos

A continuación, vamos a obtener los principales parámetros cromatográficos para cuantificar cómo ha sido la separación.

El **factor de respuesta** se puede estimar como el cociente de la señal generada (área) y la concentración de dicha especie, utilizando la ecuación 1 (Tabla 1). En el patrón estudiado, las concentraciones finales fueron 5 g/L de cada uno de los tres analitos. Para la separación D, no es posible su cálculo porque hay solapamiento de picos.

Analito	Factor de respuesta		
	1	2	3
Separación A	1,17	1,30	1,30
Separación B	1,27	1,35	1,39
Separación C	1,28	1,35	1,42
Separación D	-	-	-

Tabla 3. Estimación de los factores de respuesta (área/concentración) en los experimentos con diferente composición de la fase móvil.

La **resolución** se utiliza para evaluar el grado de separación entre dos picos consecutivos. En nuestro caso, se estudiará entre los picos 1 y 2 y entre los picos 2 y 3, utilizando la ecuación 2 (Tabla 4).

La **eficacia** es la medida de la capacidad del método para lograr la separación y evitar la dispersión de pico. En nuestro caso, se calculará el número de platos teóricos (N) asociados a cada uno de los tres analitos, utilizando la ecuación 3 (Tabla 4).

Analito	Resolución (R)		Eficacia (N)		
	1-2	2-3	1	2	3
Separación A	2,1	2,9	951	1196	1274
Separación B	1,6	1,8	1004	1303	886
Separación C	1,6	1,5	858	1296	924
Separación D	1,1	0,4	767	1024	484

Tabla 4. Cálculo de la resolución y eficacia en los experimentos con diferente composición de la fase móvil.



## 4.4 Interpretación de los resultados

La selección de las mejores condiciones cromatográficas se puede realizar de modo cualitativo y de modo cuantitativo.

### 4.4.1 Interpretación cualitativa

Consiste en observar la forma de los picos en el cromatograma. En concreto, se debe estudiar:

- Tiempos de retención y tiempo total de análisis. Se observa un descenso de los tiempos de retención de cada analito y del tiempo necesario para eluir todos los analitos cuanto mayor ha sido la proporción de agua respecto al acetonitrilo en la fase móvil.
- Simetría de los picos. En nuestros experimentos, los picos son simétricos para todos los cromatogramas. Por lo tanto, no existen *a priori* problemas asociados a falta de reproducibilidad, mal empaquetamiento de la columna, etc.
- Solapamiento entre picos asociados a los analitos. En nuestros experimentos, solamente se observa solapamiento para la separación D, indicando que se ha producido una coelución de los analitos. Es decir, que la fase móvil más polar ha originado una excesiva elución de los analitos, impidiendo un avance diferencial.
- Anchura y altura de los picos. Se ha observado que cuanto mayor ha sido la proporción de agua respecto al acetonitrilo en la fase móvil, el pico asociado a un analito dado cambia. Cuanto menor es su tiempo de retención, el pico es más estrecho y alto, es decir, se reduce su dispersión durante la separación.

### 4.4.2 Interpretación cuantitativa

Consiste en la evaluación de los parámetros cromatográficos obtenidos bajo las distintas condiciones experimentales.

- Factor de respuesta. Cuando la señal medida es el área, el factor de respuesta es similar para todas las condiciones ensayadas (Tabla 3), ya que la cantidad añadida es la misma. Las pequeñas discrepancias se asocian con las fluctuaciones en la línea base. Por otra parte, si la señal medida hubiese sido la altura, en los cromatogramas se observa que la respuesta aumenta cuando la composición de la fase móvil aumenta en polaridad.
- Resolución. El valor límite de resolución para diferenciar entre picos solapadas y picos resueltos es 1,5. De acuerdo con los valores de la Tabla 4, la separación D es la única que no proporciona una adecuada resolución, es decir, existe coelución.
- Eficacia. De acuerdo con los valores de la Tabla 4, la separación D proporciona el menor número de platos teóricos. La naturaleza de la fase móvil es muy similar a la de los analitos y fase estacionaria y se





promueve una elución excesiva. Por ese motivo, no se producen los suficientes equilibrios de los analitos entre la fase estacionaria y la fase móvil para lograr un avance diferencial.

### 4.4.3 Conclusiones

Considerando las anteriores observaciones y cálculos, se puede concluir que

- La composición de la fase móvil de la separación D no es válida para la determinación de los azúcares porque origina un método no selectivo, dado que existen especies que coeluyen y origina picos solapados.
- Las condiciones de las separaciones A y B serían válidas para lograr la separación, aunque no proporcionan el método con las mejores prestaciones analíticas.
- La composición de la fase móvil de la separación C sería recomendable para la determinación de los azúcares. Se origina un proceso de retención-elución eficiente que permita un avance diferencial de todos los analitos. Bajo dichas condiciones, el método es selectivo (no hay picos solapados), además es sensible (máxima altura de pico) y rápido (menor tiempo de análisis).

Por lo tanto, se debería seleccionar una composición de fase móvil de acetonitrilo/agua 65:35 (v/v) para obtener el método con mejores prestaciones analíticas que permita la identificación y cuantificación de los tres azúcares de forma simultánea.

## 4.5 Extrapolación a otras separaciones

En este artículo, se ha estudiado la selección de la composición de la fase móvil en la separación de tres azúcares mediante HPLC. No obstante, la metodología se puede aplicar a cualquier variable experimental, tipos y número de analitos y técnica cromatográfica. En una aproximación general, los pasos a seguir son:

- Preparación de una disolución que contenga las especies a separar.
- Separación cromatográfica cambiando la variable a estudiar y dejando el resto de variables constantes.
- Obtener información cualitativa de los cromatogramas registrados.
- Obtener información cuantitativa calculando los parámetros cromatográficos.
- Combinar la información para seleccionar aquella condición que proporciona mejores prestaciones, teniendo en cuenta el reto analítico planteado.

## 5 Cierre

A lo largo de este objeto de aprendizaje hemos visto que el registro resultante de una separación cromatográfica utilizando la técnica HPLC, depende de las condiciones experimentales. En consecuencia, la calidad de la separación con fines analíticos es diferente y puede conducir a resultados erróneos. Por lo tanto, la selección de las mejores condiciones es crucial para obtener un método de altas prestaciones. Dicha selección se debe realizar de acuerdo a criterios cualitativos basados en la observación de los cromatogramas y en el cálculo de ciertos parámetros cromatográficos. Esta metodología de trabajo tiene un carácter general, por lo que es posible aplicarla a diferentes retos analíticos siguiendo los pasos indicados en este artículo.

## 6 Bibliografía

Corradini, D.; Cazes, J.: "Handbook of HPLC", Ed. Taylor & Francis Group, 2010.

Dong, MW.: "HPLC and UHPLC for Practicing Scientists", Ed. John Wiley & Sons, 2019.

García de Marina Bayo, A.; Yusá Marco, DJ.: "HPLC instrumental", Ed. UPV, 2016.

Herraez-Hernandez, R., Campins-Falco, P., & Tortajada-Genaro, L. A. (1998). "Chiral determination of amphetamine and related compounds using chloroformates for derivatization and high-performance liquid chromatography". *Analyst*, 123(10), 2131-2137.

Kromidas, S. (Ed.): "HPLC made to measure: a practical handbook for optimization", Ed. John Wiley & Sons, 2008

Moldoveanu, SC.; David, V.: "Essentials in Modern HPLC Separations", Ed. Elsevier, 2012.

Tortajada-Genaro, LA.; González, MA.; Bañuls, MJ.; Pastor, N.; Maquieira, A.: "Aprendizaje activo en las prácticas de laboratorio de técnicas instrumentales" En Jornada de Innovación Docente, Ed. UPV, 2008, pág. 87-93

Vander Heyden, Y.; Perrin, C.; Massart, D. L. "Optimization strategies for HPLC and CZE". En *Handbook of analytical separations (Vol. 1)*, Ed. Elsevier Science BV, 2000, pág. 163-212